

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

B196

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 5 A61K 48/00, 31/70, C12N 15/12 // A61K 37/02, C12N 15/85		A1	(11) 国際公開番号 WO 95/09010
			(43) 国際公開日 1995年4月6日 (06.04.95)
(21) 国際出願番号 (22) 国際出願日		PCT/JP94/00320 1994年2月28日 (28. 02. 94)	
(30) 優先権データ 特願平5/243381		1993年9月29日 (29. 09. 93)	JP
(71) 出願人 麒麟麦酒株式会社 (KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP] 〒150 東京都渋谷区神宮前六丁目26番1号 Tokyo, (JP) 大阪府 (OSAKA PREFECTURAL GOVERNMENT) [JP/JP] 〒540 大阪府大阪市中央区大手前2丁目1番22号 Osaka, (JP)			
(72) 発明者 高橋克仁 (TAKAHASHI, Katsuhito) 〒563 大阪府池田市鉢塚3丁目9-25-506 Osaka, (JP) 柴田宣彦 (SHIBATA, Nobuhiko) 〒593 大阪府堺市堺上緑町2丁目8-31 Osaka, (JP)			
(74) 代理人 弁理士 平木祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.) 〒105 東京都港区虎ノ門二丁目7番7号 虎ノ門中田ビル2F Tokyo, (JP)			
(81) 指定国 AU, CA, CN, KR, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).			
添付公開書類		国際調査報告書	

(54) Title : ARTERIOSCLEROSIS REMEDY

(54) 発明の名称 動脈硬化治療剤

(57) Abstract

An arteriosclerosis remedy containing a carponin gene as the active ingredient, which is useful because it can inhibit the thickening of the endangium. It is therefore efficacious for the treatment of arteriosclerosis and ischemic heart diseases which may be caused thereby, such as angina pectoris and myocardial infarction. In particular, it can remarkably effectively inhibit the occurrence of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA).

(57) 要約

カルポニン遺伝子を有効成分として含む動脈硬化治療剤が提供される。本発明の動脈硬化治療剤は、血管内膜の肥厚を抑制することができるので有用である。従って、本発明の動脈硬化治療剤は、動脈硬化およびこれにより引き起こされる可能性のある狭心症や心筋梗塞症のような虚血性心疾患を有効に治療することができ、特に、経皮的冠動脈形成術(PTCA)後の再狭窄を極めて有効に防止することができる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AM	アルメニア	DK	デンマーク	LI	リヒテンシュタイン	PT	ポルトガル
AT	オーストリア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RO	ルーマニア
AU	オーストラリア	ES	スペイン	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
BB	バルバドス	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SD	スー丹
BE	ベルギー	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SE	スウェーデン
BF	ブルギナ・ファソ	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SI	スロヴェニア
BG	ブルガリア	GB	イギリス	MC	モナコ	SK	スロヴァキア共和国
BJ	ベナン	GE	グルジア	MD	モルドバ	SN	セネガル
BR	ブラジル	GN	ギニア	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	ML	マリ	TD	チャード
CA	カナダ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TG	トーゴ
CF	中央アフリカ共和国	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	TJ	タジキスタン
CG	コンゴー	IT	イタリー	MW	マラウイ	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	JP	日本	MX	メキシコ	UA	ウクライナ
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	NL	オランダ	US	米国
CN	中国	KR	朝鮮民主主義人民共和国	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン共和国
CZ	チェコ共和国	KR	大韓民国	NZ	ニュージーランド	VN	ヴィエトナム
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	PL	ポーランド		

明細書

動脈硬化治療剤

技術分野

本発明は、動脈硬化治療剤に関し、さらに詳細には、カルポニン遺伝子を利用した動脈硬化治療剤に関する。

背景技術

動脈硬化は病理学的に、脂質や結合織の沈着および平滑筋細胞やマクロファージの増殖を特徴とする内膜の病変であり、特に粥状動脈硬化は虚血性心疾患や脳卒中の原因となり、その死亡率は高い。一般に、高脂血症、高血圧、加齢、喫煙等が動脈硬化の主要な危険因子と考えられている。

動脈硬化の治療に関しては、危険因子の治療薬として抗高脂血症剤、降圧剤がその進展抑制のために用いられており、また、その発症原因を抑える治療薬として抗酸化剤、抗血小板剤、血管拡張剤、抗凝固剤等が用いられているが、現在のところ、それらの治療効果は臨床的に十分なものではない。

さらに、動脈硬化によって引き起こされる狭心症や心筋梗塞症の虚血性心疾患の初期的な治療法として経皮的冠動脈形成術(PTCA)が行われ、ある程度の成果を収めている。しかし、術後3～6ヶ月で30～40%の患者に再狭窄がみられることが大きな問題となっている。再狭窄を抑制するために薬剤投与が行われているが、十分な効果を上げているとは言えない。ところで、再狭窄は、平滑筋細胞の内膜における増殖が原因であることが種々の研究で示されており(Hanke, H. et al. Time course of smooth muscle cell proliferation in the intima and media of arteries of following experimental angioplasty. Circulation Res. 1990; 67: 651-659)、直接的に薬剤や遺伝子を再狭窄部位の平滑筋細胞の内膜に部位特異的に導入することによって、再狭窄を治療しようという試みがなされてきている。その例として、ヘパリンを再狭窄部位の平滑筋細胞の内膜に部位特異的に投与する試みがなされた(Gimple, L. W. et al. Effect of chronic s ubcutaneous or intramural administration of heparin on femoral artery re

stenosis after balloon angioplasty in hypercholesterolemic rabbits. Circulation 1992; 86: 1536-1546) が、再狭窄を抑制するために十分な効果を上げることができなかった。また、ルシフェラーゼの遺伝子をバルーニングによって生じた動脈硬化巣の平滑筋細胞に部位特異的に導入する試みがなされた(Leclerc. G. et al. Percutaneous arterial gene transfer in a rabbit model. J. Clin. Invest. 1992; 90: 936-944)が、治療に効果のある遺伝子を用いていない点で不十分であった。

従って、本発明は、上記の欠点のない動脈硬化治療剤を提供することを目的とする。すなわち、本発明は、十分な効果を有する動脈硬化治療剤を提供することを目的とする。

また、本発明は、経皮的冠動脈形成術後の再狭窄を効果的に防止できる動脈硬化治療剤を提供することを目的とする。

さらに、本発明は、上記のような動脈硬化治療剤に有用な組換えベクターを提供することを目的とする。

さらにまた、本発明は、動脈硬化の治療および動脈硬化によって引き起こされるような虚血性心疾患等の治療に有用な医薬組成物を提供することを目的とする。

また、本発明は、上記の欠点のない動脈硬化の治療方法および虚血性心疾患の治療方法を提供することを目的とする。

発明の開示

本発明者らは、銳意努力を重ねた結果、カルポニン遺伝子を血管壁に導入することにより、該血管壁内の平滑筋細胞の増殖を抑制できることを見出し、本発明を完成させるに至った。すなわち、本発明は、カルポニン遺伝子を有効成分として含む動脈硬化治療剤を提供するものである。また、本発明は、カルポニン遺伝子を含みかつ平滑筋細胞内で該遺伝子を発現することができる組換えベクターを提供するものである。さらに、本発明は、有効成分であるカルポニン遺伝子および医薬的に許容できる賦形剤を含む医薬組成物を提供するものである。さらにまた、本発明は、有効量のカルポニン遺伝子をヒトに投与することを特徴とする動脈硬化の治療方法および有効量のカルポニン遺伝子をヒトに投与することを特徴

とする虚血性心疾患の治療方法を提供するものである。

特定の理論に拘泥するわけではないが、本発明の動脈硬化治療剤は、血管壁内の平滑筋細胞でカルポニン遺伝子を発現することにより、脱分化した平滑筋細胞を再分化させ、その結果平滑筋細胞の増殖を抑制すると考えられる。

図面の簡単な説明

第1図は、ヒトカルポニンcDNAを組込んだ組換えベクターpCAGGS/hCNの制限酵素地図である。

第2図は、血管壁内へのヒトカルポニン遺伝子の導入を確認するための電気泳動写真である。レーン1はDNAを含まないネガティブコントロール、レーン2はプラスミドpCAGGSのみを投与した対照群2の総頸動脈由来のDNA、レーン3はヒトカルポニンcDNAを含む組換えベクターpCAGGS/hCNを投与したカルポニン群の総頸動脈由来のDNAを示す。

第3図は、ヒトカルポニンcDNAを含む組換えベクターpCAGGS/hCNを投与したカルポニン群の総頸動脈断面における血管内膜肥厚の様子(a)、プラスミドpCAGGSのみを投与した対照群2の総頸動脈断面における血管内膜肥厚の様子(b)、および、無処置対照群1の総頸動脈断面における血管内膜肥厚の様子(c)を示す生物的形態の写真である。

第4図は、ウサギ総頸動脈をバルーニングした後に行われた遺伝子投与の血管壁内膜の肥厚に対する抑制効果を示す図である。第4図中、横軸の対照群1はバルーニングの後に何らの処置も施さなかった無処置対照群(n=18)、対照群2はバルーニングの後にプラスミドpCAGGSのみを投与した対照群(n=7)、カルポニン群はヒトカルポニンcDNAを含む組換えベクターpCAGGS/hCNを投与した群(n=8)を表し、縦軸は各群の総頸動脈断面の内膜/中膜の面積比の数値を表す。

発明を実施するための最良の態様

本発明において使用されるカルポニン遺伝子とは、カルポニンまたはカルポニン様タンパクをコードする遺伝子をいうものとする。カルポニンは、主に哺乳類平滑筋細胞に存在するトロポニン様のタンパク質として発見され(Takahashi, K.

et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1986;141:20-26)、アクチンフィラメントに結合しミオシンATPaseの活性を阻害することが知られており(Winder. S. J. et al. J. Biol. Chem. 1990;265:10148-10155)、平滑筋の収縮制御において重要な役割を担っていると考えられている。チキンのカルポニンのアミノ酸配列は、高橋らによって決定されている(Takahashi. K. and Nadal-Ginard. B. J. Biol. Chem. 1991; 266: 13284-13288)。また、カルポニン様タンパクとしては、SM22、mp20が知られており、これらのカルポニン様タンパクのアミノ酸配列は、それぞれ、Thweatt、Ayme-Southgateらによって決定されている(Thweatt, R. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1992; 187: 1-7)(Ayme-Southgate, A. et al. J. Cell. Biol. 1989; 108: 521-531)。本発明においては、上記のカルポニンまたはカルポニン様タンパクをコードする遺伝子を使用することができる。

また、カルポニンcDNAは、最初にニワトリ砂蚕よりクローニングされて塩基配列が決定され(Takahashi. K. and Nadal-Ginard. B. J. Biol. Chem. 1991;266:13284-13288)、その後ヒト、ラットのカルポニンcDNAについてもクローニングの報告がなされている(Takahashi. K. et al. Japanese Circulation Journal 1992; 56 supplement1: 40)(Shanahan. C. M. et al. Circulation Res. 1993; 73: 193-204)。本発明においては、上記のカルポニンcDNAを使用してもよい。導入する遺伝子および発現されるタンパク質の免疫的拒絶反応を最小に抑えるために、また治療の効果を上げるために、導入する遺伝子はヒト由来のものが望ましい。好ましくは、配列番号2のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むカルポニン遺伝子、より好ましくは、配列番号1の塩基配列を含むカルポニン遺伝子を使用する。カルポニン遺伝子は補助的なコード化配列を含んでいてもよく、また、それがコードするアミノ酸配列が付加、置換、欠失されたものであっても、カルポニンと同様の機能を有するものを発現するものであればよい。本発明において使用されるカルポニン遺伝子は、公知の技術を用いて、細胞から単離精製して得られたゲノムDNAもしくはcDNAであっても、また、これらがNarang等の方法(Narang. S. A. DNA synthesis. Tetrahedron 1983;39:3)に従って化学的に合成されたものであってもよい。

また、本発明においては、カルポニン遺伝子そのもののみを導入することによ

り目的を達成しうるが、また、カルポニン遺伝子を含み平滑筋細胞内で該遺伝子を発現することができる組換えベクターを使用してもよい。本発明において使用できる組換えベクターは、カルポニン遺伝子と、該遺伝子の発現のための発現ベクターから構成される。一般的には、哺乳類細胞でタンパク質を発現させることのできるプラスミドベクターやDNAあるいはRNAのウィルスベクターを用いて、上記の発現ベクターを構築することができる。発現ベクターは、発現ベクターの複製を可能とする複製オリジン、発現のためのプロモーター、スプライスシグナル、ポリA付加シグナル、薬剤選択マーカー、エンハンサー等を必要に応じて選択し、組み合わせて構築することができるが、少なくともプロモーターを含むことが好ましい。発現ベクターの複製を可能とする複製オリジンとしては、SV40ウィルス、パピローマウィルス、EBウィルス(Epstein-barr virus)等を挙げることができ、また発現のためのプロモーターとしては、 β -アクチンプロモーター、エロンゲーションファクター1 α 、チミジンキナーゼプロモーター、SV40プロモーター、アデノウィルス主要後期プロモーター、サイトメガロウィルスプロモーター等を挙げることができる。さらに、スプライスシグナル、ポリA付加シグナル、クローン選択を効率化するためにアンピシリン耐性遺伝子等の薬剤選択マーカー、細胞特異的に働くエンハンサーの他、導入遺伝子の発現を制御する転写制御遺伝子等を付加しても良い。本発明において使用可能な組換えベクターを構築する上で好ましい発現ベクターとしては、pEF-BOS(Mizushima. S. et al. Nucleic Acid Research 1990;18:5322)、pcDL-SR α 296(Takebe. Y. et al. Molecular and Cellular Biology 1988;8:466-472)、pCAGGS(Niwa. H. et al. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. Gene 1991;108: 193-200)、pAd265SVp(A)3 (Kaufman. R. J. et al., Mol. Cell. Biol. 1985; 5: 1750-1759)等のプラスミドあるいはウィルス等を挙げることができ、このうち、pCAGGSが特に好ましい。pCAGGSは、サイトメガロウィルスのエンハンサー、チキン β -アクチンプロモーター、ラビット β -グロビン3'スプライスシグナル、ラビット β -グロビン3'隣接領域、SV40複製オリジンを有し、哺乳動物細胞中で組込んだ遺伝子を高い効率で発現させることができる。

本発明において使用可能な組換えベクターは、当該技術の熟練者によく知られる技術 (Maniatis. T. et al. Molecular cloning: A laboratory manual 1989; Cold spring harbor laboratory) を用いて、上記のような発現ベクターにカルボニン遺伝子を組込むことによって構築することができる。

カルボニン遺伝子、または、カルボニン遺伝子を含みかつ平滑筋細胞内で該遺伝子を発現することができる組換えベクター（以下、「カルボニン遺伝子を含む組換えベクター」と記す。）を医薬的に許容できる賦形剤とともに医薬組成物として、溶液、懸濁液、ゲル等の形態に製剤化して、投与することができる。

また、カルボニン遺伝子、または、カルボニン遺伝子を含む組換えベクターを膜の中に封入した粒子を医薬的に許容できる賦形剤とともに医薬組成物として、溶液、懸濁液、ゲル等の形態に製剤化して、投与してもよい。カルボニン遺伝子またはカルボニン遺伝子を含む組換えベクターを膜の中に封入することにより、該遺伝子または該組換えベクターをヌクレアーゼによる消化から防ぐことができ、またカルボニン遺伝子を導入する細胞を傷害することなく細胞内に高効率で導入することができる。リポソーム (Wong. T. K. et al. Science 1980;215:166) や脂質エマルジョン等の合成膜の他、植物細胞から取ったプロトプラスト (Schaffner. W. Proc. Natl. Acad. Sci. 1980;77:2163)、レトロウィルスのようなウィルスのキャップシド (Cone. R. D. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 1984;81:6349)、赤血球膜ゴースト (Furusawa. M. et al. Nature 1974;249:449) 等の天然由来の膜を利用することができるが、このうち、リポソームが好ましい。というのは、カルボニン遺伝子またはカルボニン遺伝子を含む組換えベクターに特別な処理を施すことなくそのまま用いてリポソーム中に封入することができ、また、ヒトに存在する脂質またはヒトの体内で代謝される脂質をリポソーム形成原料として用いれば、カルボニン遺伝子導入後にリポソームは代謝されて無害となる利点を有するからである。リポソームを形成する原料としては、N-[1-(2,3-ジオレオイロキシ)-プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムメチルサルフェート (DOTAP)、N-[1-(2,3-ジオレイロキシ)-プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロライド (DOTMA)、ジラウロイルフォスファチジルコリン (DLPC)、ジオレオイルフォスファチジルエタノールアミン (DOPE)、ジラウロイルフォスファチジルエタノールアミン (DLPE)、ジミ

リストイルフォスファチジルエタノールアミン(DMPE)、ジオレオイルフォスファチジルコリン(DOPC)、ジミリストイルフォスファチジルコリン(DMPC)、N-(α -トリメチルアンモニオアセチル)-ジドデシル-D-グルタメートクロライド(TMAG)等の脂質、およびこれらの混合物をあげることができる。これらの脂質は、カルポニン遺伝子DNA やカルポニン遺伝子を含む組換えベクターDNA に傷害を与えることなく、これらのDNA を効率よく取り込める十分な内容積を持つ大きな一枚膜リポソーム(LUV)を形成するので好ましい。例えば、N-[1-(2,3-ジオレイロキシ)-プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロライド(DOTMA)とジオレオイルフォスファチジルエタノールアミン(DOPE)の1:1(w/w)の混合物(Felgner, D. L. et al. Lipofection:A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. Proc. Natl. Acad. Sci. 1987;84: 7413)やN-(α -トリメチルアンモニオアセチル)-ジドデシル-D-グルタメートクロライド(TMAG)とジラウロイルフォスファチジルコリン(DLPC)とジオレオイルフォスファチジルエタノールアミン(DOP E)の1:2:2(mol/mol/mol)の混合物(Koshizaka, T. et al. J. Clin. Biochem. Nutr. 1989;7:185)等は、DNAを取り込むリポソームを形成することが知られている。上記の脂質のうち、細胞毒性が低いことから、N-[1-(2,3-ジオレイロキシ)-プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムメチルサルフェート(DOTAP)が特に好ましい。さらに、リポソームの表面にHVJ(Hemagglutinating virus of Japan)の糖タンパクを組込み、あるいは共有結合させたり、ポリエチレングリコール等を添加すると、細胞への遺伝子導入の効率が上がる。また、平滑筋細胞へのターゲッティングの特異性を上げるために、平滑筋細胞表面に特異的な抗体や受容体リガンドをリポソームに組み込み、あるいは共有結合させてもよい。

カルポニン遺伝子またはカルポニン遺伝子を含む組換えベクターは、当業界の熟練者によく知られている技術を用いて、上記のような膜の中に封入することができる。例えば、Danos, O. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 1988;85:6460 またはVenkatesh, L. K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 1990; 87:8746 に記載の方法に準じて、カルポニン遺伝子またはカルポニン遺伝子を含む組換えベクターをウイルスキャップシド中に封入することができる。また、カルポニン遺伝子またはカルポニン遺伝子を含む組換えベクターを合成膜の中に封入するためには、カルポ

ニン遺伝子またはカルポニン遺伝子を含む組換えベクターを、上記のような脂質、および、水、Hepes 緩衝生理食塩水(150mM NaCl/20mM Hepes, pH7.4)、トリス-塩酸緩衝液等の液媒体と混合し、攪拌すればよい。さらに、カルポニン遺伝子またはカルポニン遺伝子を含む組換えベクターを合成膜の中に封入する際に、ポリエチレングリコール、植物レクチン等を添加してもよい。本発明の動脈硬化治療剤において、カルポニン遺伝子と膜の比率、および、カルポニン遺伝子を含む組換えベクターと膜の比率は、カルポニン遺伝子の所望の発現量が得られるように選択されるが、膜の中にカルポニン遺伝子またはカルポニン遺伝子を含む組換えベクターが10～50重量%の割合で含まれることが好ましい。

本発明の動脈硬化治療剤の投与形態の一例としては、静脈内投与を挙げることができるが、カテーテルを用いた局所投与が好ましい。カテーテルを用いることにより、本発明の動脈硬化治療剤を患部近くに移入し、かつ、高い効率で血管壁内の患部に導入することができる。代表的なカテーテルとしては、シングルバルーンカテーテル、ウォリンスキーコロナリーインフュージョンカテーテル(Wolinsky Coronary Infusion Catheter)、ダブルバルーンカテーテル(Double Balloon Catheter)等を挙げることができる。また、ダブルバルーンカテーテルを用いた投与方法としては、Chang らの方法(Chang, S. et al. Direct *in vivo* gene transfer into the coronary and peripheral vasculatures of the intact dog. *Circulation.* 1991;83:2007-2011)等がある。

有効成分である、任意に膜内に封入されたカルポニン遺伝子またはカルポニン遺伝子を含む組換えベクターを医薬的に許容できる賦形剤とともに医薬組成物として、従来の製剤上の慣用技術に従って、製剤化することができる。医薬的に許容できる賦形剤としては、希釈剤、充填剤、滅菌した水性媒体および種々の無毒性有機溶媒を挙げることができる。また、この医薬組成物に、製剤上許容しうるもの、例えば、安定剤、緩衝剤、等張剤等を適宜組み合わせ、あるいは選択して添加することができる。ここで、安定剤の例として、グルコース、マンニトール等の糖類、グリシン等のアミノ酸類、HSA、BSA、あるいはゼラチン等が、緩衝剤の例として、トリス緩衝剤、PBS緩衝剤、クエン酸緩衝剤、酢酸緩衝剤、あるいはHEPES緩衝剤等が、等張剤の例として、塩化ナトリウム等の塩類、

グルコース、マンニトール等の糖類等があり、これらの水溶液に有効成分を溶解、もしくは懸濁した製剤を用いることができる。また、遺伝子導入の効率をあげるために、ポリエチレングリコールやDMSO等を添加することもできる。

カルポニン遺伝子またはカルポニン遺伝子を含む組換えベクターを膜の中に封入することなく用いる場合には、リン酸カルシウム共沈法(Graham, F. L. et al. Virology 1973;52:456)、DEAE-デキストラン法(McCutchan, J. H. et al. J. Natl. Cancer Inst. 1968;41:351)等を用いたインビボ(*in vivo*)トランスフェクション、または、カルポニン遺伝子またはカルポニン遺伝子を含む組換えベクターとハイドロゲルとをコートしたシングルバルーンカテーテルによるバルーニング等の方法を用いて、製剤を血管壁内の患部に適用することにより、カルポニン遺伝子を患部の平滑筋細胞内に導入することができる。また、カルポニン遺伝子またはカルポニン遺伝子を含む組換えベクターを膜の中に封入して用いる場合には、ダブルバルーンカテーテルを用いて一定時間のインキュベートを行なったり、ウォリンスキーコロナリーインフュージョンカテーテルを用いた血管壁内への注入により、製剤を血管壁内の患部に適用することによって、カルポニン遺伝子を患部の平滑筋細胞内に導入することができる。

本発明の動脈硬化治療剤の投与量は、年齢、性別、症状、投与経路、投与回数、剤型などによって異なるが、一般に、成人では一日当たりカルポニン遺伝子の重量にして、約 $20\mu g$ ～ $600mg$ の範囲が適当である。

本発明の動脈硬化治療剤は、哺乳類の平滑筋細胞に存在するカルポニンをコードする遺伝子を有効成分とすることから、毒性が低く安全性が高いと考えられる。また、カルポニン遺伝子を平滑筋培養細胞に導入することによって、c-fos(c-fos)のようなプロトオンコジーンの発現を抑制することも知られていることから、本発明の動脈硬化治療剤は発癌性の点においても安全性が高いと考えられる。さらに、本発明の動脈硬化治療剤は、カルポニン遺伝子またはカルポニン遺伝子を含む組換えベクターをリポソーム等の膜の中に封入することにより、細胞毒性がさらに低減される。

本発明を、以下の実施例によりさらに詳細に説明する。これらの実施例は説明のためのものであり、本発明の範囲を限定するものではない。

〔実施例〕

1. ヒトカルポニンcDNAのクローニング

日本人の肝臓ガン患者（男子、54才）の大動脈より、Chirgwin (Chirgwin, J. M. et al. Biochemistry 1977;18:5294-5299) らの方法に従って、RNA を精製した。さらにこのRNA から、オリゴテックス™-dT30<Super> （カタログ番号 9021B、宝酒造社製）を用いて、poly(A) + RNA を精製した。poly(A) + RNA から、ZAP-cDNA合成キット（カタログ番号200400、ストラタジーン社製）とギガパック® II ゴールド（カタログ番号200216、ストラタジーン社製）を用いて、ヒト大動脈入 ZAP® -cDNA ライブライリーを作成した。このライブライリーからの組換え体をナイロンメンブレンフィルター Hybond™-N+（カタログ番号RPN.137B、アマシャム社製）にプレートし、ニワトリカルポニンcDNA (Takahashi, K. and Nadal-Ginard, B. J. Biol. Chem. 1991;266:13284-13288) をプローブとして、プラーカハイブリダイゼーションを行い、陽性クローンを得た。陽性クローンをf1ヘルパーファージ R408, VCSM13 で感染させることによって、pBluescript SK- にサブクローニングし、そのなかで最長のクローンを選択し、pBluescript SK-hCNとした (Takahashi, K. et al. Japanese Circulation Journal 1992;56 supplement1:40)。これをシーケエナース® Version2.0 DNAシークエンシングキット（カタログ番号70781、USB 社製）を用いてシークエンスした。得られたヒトカルポニンcDNAの塩基配列を、配列表の配列番号1に示す。

2. カルポニン遺伝子を含む組換えベクターの構築

上記1. で調製したpBluescript SK- hCN のヒトカルポニンcDNA5'側にXhoI制限酵素部位を挿入するために、このプラスミドを制限酵素SmaI（ベーリンガーマンハイム社製）で直線化し、アニーリングしたXhoIリンカー（ベーリンガーマンハイム社製）とT4 DNAリガーゼ（宝酒造社製）を用いてライゲートした。この反応液を用いてE. coli DH5 α 株（ライフテクノロジー社より入手）を形質転換し、形質転換株培養液よりプラスミドを精製して、制限酵素XhoI（ベーリンガーマンハイム社製）で処理したところ、XhoI消化によってヒトカルポニンcDNA 1522bp を含む断片とpBluescript SK- プラスミドの断片を生じることから、目的のプラスミドであることが確認された。

次に、このプラスミドを制限酵素Xholで処理し、0.8%アガロースゲル電気泳動により、配列番号1に示されたヒトカルポニンcDNA1522bpを含む断片を分離し、プレップ-A-ジーンDNA精製キット（カタログ番号732-6010、バイオラッド社製）を用いて精製した。このDNA断片を、制限酵素Xholで処理したプラスミドpCAGGS(Niwa.H. et al. Gene 1991;108: 193-200)とT4 DNAリガーゼを用いてライゲートした。この反応液を用いてE.coli DH5 α 株を形質転換し、形質転換株培養液よりプラスミドを精製して、ヒトカルポニンcDNAの挿入及びプロモーターに対するヒトカルポニンcDNAの方向性を確認するために、制限酵素Xhol及びPstI（ベーリングーマンハイム社製）で処理したところ、Xhol消化によりヒトカルポニンcDNA 1522bpを含む断片、及びPstI消化によりヒトカルポニンcDNA3'側とラビット β -グロビン3'隣接領域を含む約1270bpの断片を生じることから、ヒトカルポニン発現のための組換えベクターであるプラスミドpCAGGS/hCNであることが確認された。

第1図にヒトカルポニンcDNAを含む組換えベクターpCAGGS/hCNの制限酵素地図を示す。組換えベクターpCAGGS/hCNの大きさは、約6.5 kbである。

3. リポソーム中への封入

N-[1-(2,3-ジオレオイロキシ)-プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムメチルサルフェート(DOTAP)（ベーリングーマンハイム社製）(1 mg/ml) 60 μ lを、Hepes緩衝生理食塩水(Hepes, 20mM; NaCl, 150mM; pH7.4) 190 μ lで希釈した。これとは別に、上記2.で構築した組換えベクターpCAGGS/hCN 30 μ gをHepes緩衝生理食塩水250 μ lに溶解した。これら2つの溶液を混合し、室温で20分以上インキュベートすることにより、pCAGGS/hCNをリポソーム中に封入した粒子を得た。

また、対照実験のために、上記2.で構築した組換えベクターpCAGGS/hCNの代わりに、プラスミドpCAGGSを用いて、上記の操作を繰り返すことにより、プラスミドpCAGGSをリポソーム中に封入した粒子を得た。

4. 動脈硬化治療剤の調製

上記3.で作成した組換えベクターpCAGGS/hCNをリポソーム中に封入した粒子を含有する液500 μ lに、トリパンブルー10 μ l(シグマ社製)、生理食塩水 300

μ lを加えて混合して計 800 μ lとし、これを動脈硬化治療剤とした。

また、組換えベクター pCAGGS/hCNの代わりに、プラスミドpCAGGSをリポソーム中に封入した粒子を用いて、上記の操作を繰り返すことにより、コントロール溶液を調製した。

5. 経皮的遺伝子導入術 (Pericutaneous Transluminal Gene Transfer(PTGT))

PTCA用バルーンカテーテル (C.R.Bard Inc. 社製) を用いて、ウサギ 18 匹の総頸動脈部を 4 ~ 5 cm にわたって 5 気圧で 3 回バルーンを膨らませて擦過した。

2 日後、上記の処理を施したウサギの耳静脈に 22G サーフロー (メディキット社製) を挿入し、麻酔用ラボナール 1A (田辺製薬社製) (チオペンタールナトリウム 0.3 g、炭酸ナトリウム 0.18 g) を生理食塩水 30ml に溶かした溶液 4 ~ 5 ml をゆっくりと静注して、前記のウサギを麻酔した後、台に固定した。

組換えベクター pCAGGS/hCNをリポソーム中に封入した粒子を含有する動脈硬化治療剤を、ウォリンスキーコロナリーインフュージョンカテーテル (C.R.Bard Inc. 社製) を用いて、経皮的遺伝子導入術(PTGT)により、ウサギに投与した。まず、総頸動脈部を擦過した前記のウサギの鼠径部を切開した後、大腿動脈を露出し、仰臥位にして糸掛けしサーフローにて大腿動脈を穿孔した。長さ 2 cm のスウェットバルーン (C.R.Bard Inc. 社製) に PTCA用ガイドワイヤー (C.R.Bard Inc. 社製) を装着して、ウォリンスキーコロナリーインフュージョンカテーテルをセットした。あらかじめバルーンで擦過した総頸動脈を X 線透視下に選択し、ガイドワイヤーをできるだけ遠位 (2 日前にバルーニングした部分) までもっていき、スウェットバルーンの先端を内頸動脈と外頸動脈の分岐点より 1 cm 近位の所に留置した。

次に、30cm耐圧チューブ (カタログ番号 9070112、NAMIC 社製) の先端に 18F 針 (テルモ社製) をつけ、上記 4. で調製した動脈硬化治療剤 800 μ l を吸引した。これをスウェットバルーンの注入口につなぎ、 BasixTMインデフレーター (MERIT Medical 社製) で 8 気圧を維持しながら、10 回転させて、約 8 秒間で、2 日前にバルーニングした遠位側 2 cm の部分に動脈硬化治療剤を注入した。ガイドワイヤーとスウェットバルーンを総頸動脈からぬき、穿孔および切開部に抗生素

剤セフォタックス（中外製薬社製）0.5gを20mlの生理食塩水に溶解した液のうち3mlを局注し、残りを静注した。

組換えベクターpCAGGS/hCNをリポソーム中に封入した粒子を含有する動脈硬化治療剤の代わりにプラスミドpCAGGSをリポソーム中に封入した粒子を含有するコントロール溶液を用いて、上記の操作を繰り返した（対照群2）。

対照群1には、2日前にバルーニングした部位の近位側2～3cmの部分に、何らの処置も施さなかった。

6. 血管内膜肥厚の確認

経皮的遺伝子導入術(PTGT)実施後14日目に、バルーニングをおこなったウサギの総頸動脈を摘出した。4mm程度の長さの血管をティッシュテッククリオモルド(Miles Laboratory社製)の中に立て、ティッシュテック OCT Compound 4583 (Miles Laboratory社製)を使って凍結ブロックを作製した。クリオスタットを使って5～6μmの厚さの凍結切片を作製し、これを風乾した後、ヘマトキシリン・エオジン染色をおこなった。血管内膜の肥厚の程度は、ヒトカルポニンcDNAを含む組換えベクターpCAGGS/hCNを投与したカルポニン群(n=8)、無処置対照群1(n=18)、プラスミドpCAGGSのみを投与した対照群2(n=7)について、それぞれの総頸動脈壁断面の顕微鏡写真で評価した。これらの顕微鏡写真を第3図に示す。第3図は、ヒトカルポニンcDNAを含む組換えベクターpCAGGS/hCNを投与したカルポニン群の総頸動脈断面における血管内膜肥厚の様子(a)、プラスミドpCAGGSのみを投与した対照群2の総頸動脈断面における血管内膜肥厚の様子(b)、および、無処置対照群1の総頸動脈断面における血管内膜肥厚の様子(c)を示す。第3図に見られるように、ヒトカルポニンcDNAを含む組換えベクターpCAGGS/hCNを投与したカルポニン群は、無処置対照群1およびプラスミドpCAGGSのみを導入した対照群2に比較して、血管壁内膜の肥厚の程度が低かった。

また血管壁内膜の肥厚の程度を数値化するために、内膜および中膜の面積をプランニメーターを用いて計測し、内膜／中膜の面積比を内膜の肥厚度として計算した(Nabel, E. G. et al. J. Clin. Invest. 1993; 91:1822-1829)。その結果を第4図に示す。第4図中、横軸の対照群1はバルーニングの後に何らの処置も施さなかった無処置対照群(n=18)、対照群2はバルーニングの後にプラスミドpC

AGGSのみを投与した対照群 (n=7)、カルポニン群はヒトカルポニンcDNAを含む組換えベクターpCAGGS/hCNを投与した群 (n=8)を表し、縦軸は各群の総頸動脈断面の内膜／中膜の面積比の数値を表す。第4図中、*および**は、t-検定により、それぞれ、0.05%以下、0.005%以下の危険率(p)で有意差があることを示す。ヒトカルポニンcDNAを含む組換えベクターpCAGGS/hCNを投与したカルポニン群は、無処置対照群1およびプラスミドpCAGGSのみを導入した対照群2と比較して、有意に内膜肥厚の程度が低いことが確認できた。

以上のことから、本発明の動脈硬化治療剤は、経皮的血管形成術(PTCA)後の再狭窄を効果的に防止することが証明された。

7. 血管壁内へのヒトカルポニン遺伝子導入の確認

ヒトカルポニンcDNAを含む組換えベクターpCAGGS/hCNを投与したカルポニン群(n=8)およびプラスミドpCAGGSのみを投与した対照群2(n=7)について、上記6.で摘出した総頸動脈部位の血管標品に、重量の3倍量のPBS(Phosphate Buffered Saline)(8g/l NaCl, 0.2g/l KCl, 1.15g/l Na₂HPO₄, 0.2g/l KH₂PO₄)を加えて、鉗で細かく切断した後にホモジナイズした。15,000回転で3分間遠心し、その上清からセパジーン(カタログ番号SG-0025、三光純薬社製)を用いてDNAを抽出した。このDNA 10μgをXbaI(ベーリングマンハイム社製)で処理し、フェノール・クロロホルムで抽出した後エタノール沈殿させ、得られた沈殿物を20μlの水に溶解してDNAの濃度を波長260nmにおける吸光度により測定した。

DNA 2 μgに相当するこの溶液中のDNAを錆型とし、ヒトカルポニンcDNAの5'および3'非翻訳領域にある塩基配列をもつ2種の合成オリゴヌクレオチド
5' GAGTGTGCAGACCGAACTTCAGCC 3' (配列番号3:配列番号1の配列の18-41のセンス配列) および

5' GGCTGGGCCCTGGCTGGGTCCAGCC 3' (配列番号4:配列番号1の配列の1046-1069のアンチセンス配列)

をプライマーとして、GeneAmpTM PCR Reagent Kit with AmpliTaqTM DNA Polymerase(カタログ番号PJ5100、宝酒造社製)を用いて、94°Cで1分間の変性条件、55°Cで2分間のアニール条件、72°Cで2分間の合成条件で、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行い、上記のヒトカルポニン特異的プライマーに挟まれたDNAフラグ

メント (1052bp) が増幅されるかどうかを1.2%アガロースゲルで確認した。

その結果を第2図に示す。第2図において、レーン1はDNAを含まないネガティブコントロール、レーン2はプラスミドpCAGGSのみを投与した対照群2の総頸動脈由来のDNA、レーン3はヒトカルポニンcDNAを含む組換えベクターpCAGGS/hCNを投与したカルポニン群の総頸動脈由来のDNAを示す。レーン3においては1052bpのDNA断片を検出することができたが、レーン2においてはこの断片を検出することはできなかった。この結果は、ヒトカルポニンcDNAを含む組換えベクターpCAGGS/hCNを投与したカルポニン群のみに、ヒトカルポニンcDNA遺伝子が導入されたことを示している。

産業上の利用可能性

本発明の動脈硬化治療剤は、血管内膜の肥厚を抑制することができるので有用である。従って、本発明の動脈硬化治療剤は、動脈硬化およびこれにより引き起こされる可能性のある狭心症や心筋梗塞症のような虚血性心疾患を有効に治療することができ、特に、経皮的冠動脈形成術(PTCA)後の再狭窄をきわめて有効に防止することができる。

配列表

配列番号：1

配列の長さ：1522

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

生物名：ヒト

配列

AACATGTGAG GAGGGAAAGAG TGTGCAGACG GAACTTCAGC CGCTGCCTCT GTTCTCAGCG	60	
TCAGTGCCGC CACTGCCCCC GCCAGAGCCC ACCGGCCAGC ATG TCC TCT GCT CAC	115	
Met Ser Ser Ala His		
	5	
TTC AAC CGA GGC CCT GCC TAC GGG CTG TCA GCC GAG GTT AAG AAC AAG	163	
Phe Asn Arg Gly Pro Ala Tyr Gly Leu Ser Ala Glu Val Lys Asn Lys		
10	15	20
CTG GCC CAG AAG TAT GAC CAC CAG CGG GAG CAG GAG CTG AGA GAG TGG	211	
Leu Ala Gln Lys Tyr Asp His Gln Arg Glu Gln Glu Leu Arg Glu Trp		
25	30	35
ATC GAG GGG GTG ACA GGC CGT CGC ATC GGC AAC AAC TTC ATG GAC GGC	259	
Ile Glu Gly Val Thr Gly Arg Arg Ile Gly Asn Asn Phe Met Asp Gly		
40	45	50
CTC AAA GAT GGC ATC ATT CTT TGC GAA TTC ATC AAT AAG CTG CAG CCA	307	
Leu Lys Asp Gly Ile Ile Leu Cys Glu Phe Ile Asn Lys Leu Gln Pro		
55	60	65
GGC TCC GTG AAG AAG ATC AAT GAG TCA ACC CAA AAT TGG CAC CAG CTG	355	

Gly Ser Val Lys Lys Ile Asn Glu Ser Thr Gln Asn Trp His Gln Leu			
70	75	80	85
GAG AAC ATC GGC AAC TTC ATC AAG GCC ATC ACC AAG TAT GGG GTG AAG			403
Glu Asn Ile Gly Asn Phe Ile Lys Ala Ile Thr Lys Tyr Gly Val Lys			
90	95		100
CCC CAC GAC ATT TTT GAG GCC AAC GAC CTG TTT GAG AAC ACC AAC CAT			451
Pro His Asp Ile Phe Glu Ala Asn Asp Leu Phe Glu Asn Thr Asn His			
105	110		115
ACA CAG GTG CAG TCC ACC CTC CTG GCT TTG GCC AGC ATG GCG AAG ACG			499
Thr Gln Val Gln Ser Thr Leu Leu Ala Leu Ala Ser Met Ala Lys Thr			
120	125		130
AAA GGA AAC AAG GTG AAC GTG GGA GTG AAG TAC GCA GAG AAG CAG GAG			547
Lys Gly Asn Lys Val Asn Val Gly Val Lys Tyr Ala Glu Lys Gln Glu			
135	140		145
CGG AAA TTC GAG CCG GGG AAG CTA AGA GAA GGG CGG AAC ATC ATT CGG			595
Arg Lys Phe Glu Pro Gly Lys Leu Arg Glu Gly Arg Asn Ile Ile Gly			
150	155		165
CTG CAG ATG GGC ACC AAC AAG TTT GCC AGC CAG CAG GGC ATG ACG GCC			643
Leu Gln Met Gly Thr Asn Lys Phe Ala Ser Gln Gln Gly Met Thr Ala			
170	175		180
TAT GGC ACC CGG CGC CAC CTC TAC GAC CCC AAG CTG GGC ACA GAC CAG			691
Tyr Gly Thr Arg Arg His Leu Tyr Asp Pro Lys Leu Gly Thr Asp Gln			
185	190		195
CCT CTG GAC CAG GCG ACC ATC AGC CTG CAG ATG GGC ACC AAC AAA GGA			739
Pro Leu Asp Gln Ala Thr Ile Ser Leu Gln Met Gly Thr Asn Lys Gly			
200	205		210
GCC AGC CAG GCT GGC ATG ACT GCG CCA GGG ACC AAG CGG CAG ATC TTC			787
Ala Ser Gln Ala Gly Met Thr Ala Pro Gly Thr Lys Arg Gln Ile Phe			
215	220		225

GAG CCG GGG CTG GGC ATG GAG CAC TGC GAC ACG CTC AAT GTC AGC CTG		835
Glu Pro Gly Leu Gly Met Glu His Cys Asp Thr Leu Asn Val Ser Leu		
230	235	240
CAG ATG GGC AGC AAC AAG GGC GCC TCG CAG CGG GGC ATG ACG GTG TAT		883
Gln Met Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ser Gln Arg Gly Met Thr Val Tyr		
250	255	260
GGG CTG CCA CGC CAG GTC TAC GAC CCC AAG TAC TGT CTG ACT CCC GAG		931
Gly Leu Pro Arg Gln Val Tyr Asp Pro Lys Tyr Cys Leu Thr Pro Glu		
265	270	275
TAC CCA GAG CTG GGT GAG CCC GCC CAC AAC CAC CAC GCA CAC AAC TAC		979
Tyr Pro Glu Leu Gly Glu Pro Ala His Asn His His Ala His Asn Tyr		
280	285	290
TAC AAT TCC GCC TAGGGCCACA AGGCCTTCCC TGTTTCCCC CCAAGGGAGG		1031
Tyr Asn Ser Ala		
295		
CTGCTGCTGC TCTTGGCTGG ACCCAGCCAG GCCCAGCCGA CCCCCCTCTCC CTGCATGGCA	1091	
TCCTCCAGCC CCTGTAGAAC TCAACCTCTA CAGGGTTAGA GTTGGAGAG ACCAGACTGG	1151	
CGGGGGGCC ATTGGGGGGA AGGGGACCT CCGCTCTGTA GTGCTACAGG GTCCAACATA	1211	
GAGCCGGGTG TCCCCAACAG CGCCCAAAGG ACGCACTGAG CAACGCTATT CCAGCTGTCC	1271	
CCCCACTCCC TCACAAGTGG GTACCCCCAG GACCAGAACG TCCCCAGCA AAGCCCCAG	1331	
AGCCCAGGCT CGGCCTGCC CCACCCCATT CCCGCAGTGG GAGCAAATG CATGCCAGA	1391	
GACCCAGCGG ACACACGCGG TTTGGTTTGC AGCGACTGGC ATACTATGTG GATGTGACAG	1451	
TGGCGTTTGT AATGAGAGCA CTTCTTTTT TTTCTATTC ACTGGAGCAC AATAATGGC	1511	
TGTAAAATCT C		1522

配列番号：2

配列の長さ：297

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

Met Ser Ser Ala His Phe Asn Arg Gly Pro Ala Tyr Gly Leu Ser		
5	10	15
Ala Glu Val Lys Asn Lys Leu Ala Gln Lys Tyr Asp His Gln Arg		
20	25	30
Glu Gln Glu Leu Arg Glu Trp Ile Glu Gly Val Thr Gly Arg Arg		
35	40	45
Ile Gly Asn Asn Phe Met Asp Gly Leu Lys Asp Gly Ile Ile Leu		
50	55	60
Cys Glu Phe Ile Asn Lys Leu Gln Pro Gly Ser Val Lys Lys Ile		
65	70	75
Asn Glu Ser Thr Gln Asn Trp His Gln Leu Glu Asn Ile Gly Asn		
80	85	90
Phe Ile Lys Ala Ile Thr Lys Tyr Gly Val Lys Pro His Asp Ile		
95	100	105
Phe Glu Ala Asn Asp Leu Phe Glu Asn Thr Asn His Thr Gln Val		
110	115	120
Gln Ser Thr Leu Leu Ala Leu Ala Ser Met Ala Lys Thr Lys Gly		
125	130	135
Asn Lys Val Asn Val Gly Val Lys Tyr Ala Glu Lys Gln Glu Arg		
140	145	150
Lys Phe Glu Pro Gly Lys Leu Arg Glu Gly Arg Asn Ile Ile Gly		
155	160	165
Leu Gln Met Gly Thr Asn Lys Phe Ala Ser Gln Gln Gly Met Thr		
170	175	180
Ala Tyr Gly Thr Arg Arg His Leu Tyr Asp Pro Lys Leu Gly Thr		
185	190	195
Asp Gln Pro Leu Asp Gln Ala Thr Ile Ser Leu Gln Met Gly Thr		
200	205	210

Asn Lys Gly Ala Ser Gln Ala Gly Met Thr Ala Pro Gly Thr Lys
215 220 225
Arg Gln Ile Phe Glu Pro Gly Leu Gly Met Glu His Cys Asp Thr
230 235 240
Leu Asn Val Ser Leu Gln Met Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ser Gln
245 250 255
Arg Gly Met Thr Val Tyr Gly Leu Pro Arg Gln Val Tyr Asp Pro
260 265 270
Lys Tyr Cys Leu Thr Pro Glu Tyr Pro Glu Leu Gly Glu Pro Ala
275 280 285
His Asn His Ala His Asn Tyr Tyr Asn Ser Ala
290 295

配列番号：3

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GAGTGTGCAG ACGGAACCTTC AGCC

配列番号：4

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

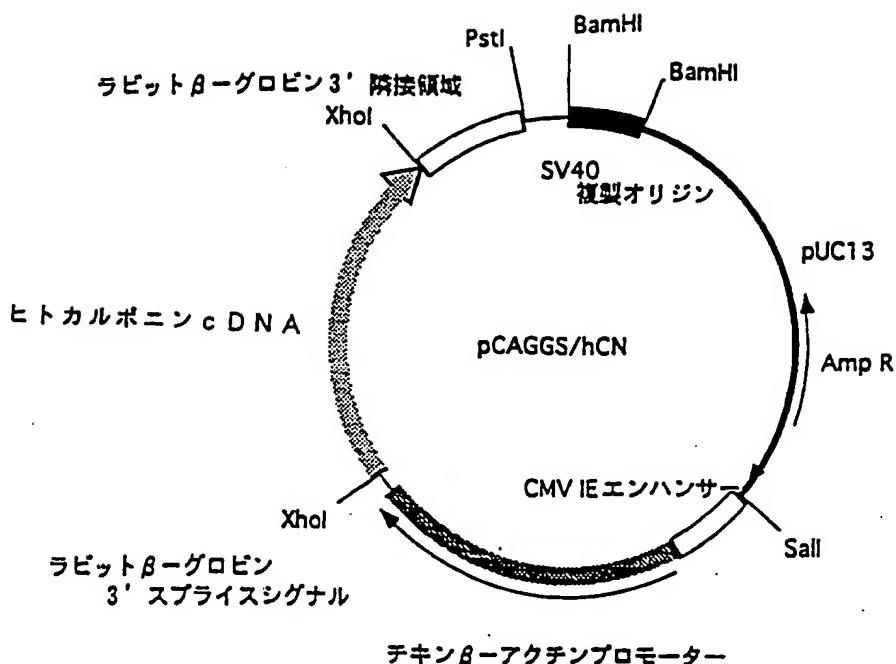
配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GGCTGGGCCT GGCTGGGTCC AGCC

請求の範囲

1. カルポニン遺伝子を有効成分として含む動脈硬化治療剤。
2. カルポニン遺伝子が配列番号2のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むものである、請求の範囲第1項記載の動脈硬化治療剤。
3. カルポニン遺伝子が配列番号1の塩基配列を含むものである、請求の範囲第2項記載の動脈硬化治療剤。
4. カルポニン遺伝子が合成または天然由来の膜の中に封入されたものである、請求の範囲第1項～第3項のいずれかに記載の動脈硬化治療剤。
5. カルポニン遺伝子がリポソームの中に封入されたものである、請求の範囲第4項記載の動脈硬化治療剤。
6. カルポニン遺伝子が、平滑筋細胞内で該遺伝子を発現することができる組換えベクターに含まれたものである、請求の範囲第1項～第3項のいずれかに記載の動脈硬化治療剤。
7. 組換えベクターがプロモーターを含むものである、請求の範囲第6項記載の動脈硬化治療剤。
8. プロモーターが β -アクチンプロモーターである、請求の範囲第7項記載の動脈硬化治療剤。
9. 組換えベクターが約6.5 kbの大きさを有し、サイトメガロウィルスのエンハンサー、チキン β -アクチンプロモーター、ラビット β -グロビン3'スプライシングナル、ラビット β -グロビン3'隣接領域、SV40複製オリジン、およびヒトカルポニンcDNAを含み、下記の制限酵素地図で表される組換えベクターpCAGGS/hCNである、請求の範囲第8項記載の動脈硬化治療剤。



10. カルポニン遺伝子を含む組換えベクターが合成または天然由来の膜の中に封入されたものである、請求の範囲第6項～第9項のいずれかに記載の動脈硬化治療剤。

11. カルポニン遺伝子を含む組換えベクターがリポソームの中に封入されたものである、請求の範囲第10項記載の動脈硬化治療剤。

12. カルポニン遺伝子を含みかつ平滑筋細胞内で該遺伝子を発現することができる組換えベクター。

13. カルポニン遺伝子が配列番号2のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むものである、請求の範囲第12項記載の組換えベクター。

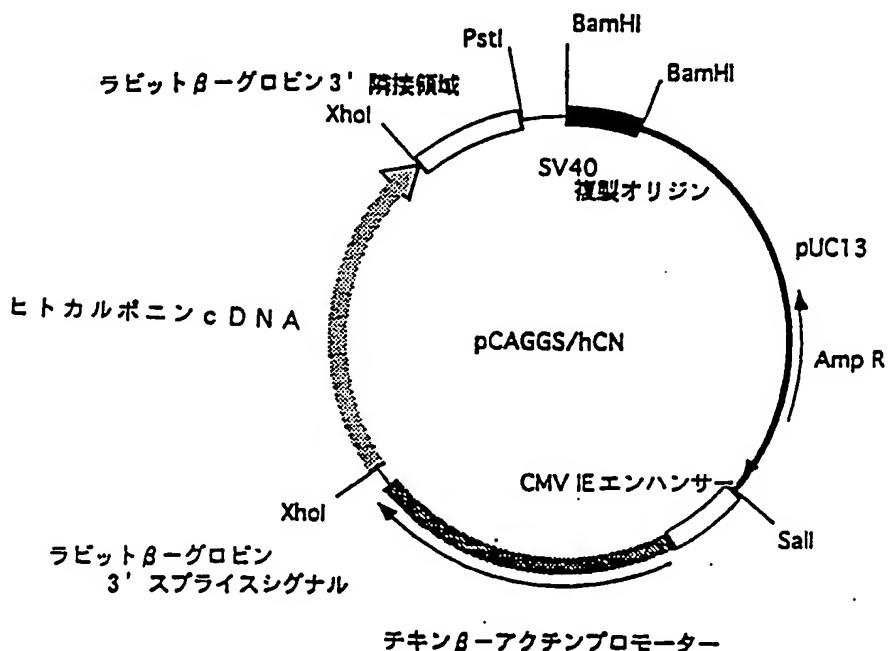
14. カルポニン遺伝子が配列番号1の塩基配列を含むものである、請求の範囲第13項記載の組換えベクター。

15. 組換えベクターがプロモーターを含むものである、請求の範囲第12項～第14項のいずれかに記載の組換えベクター。

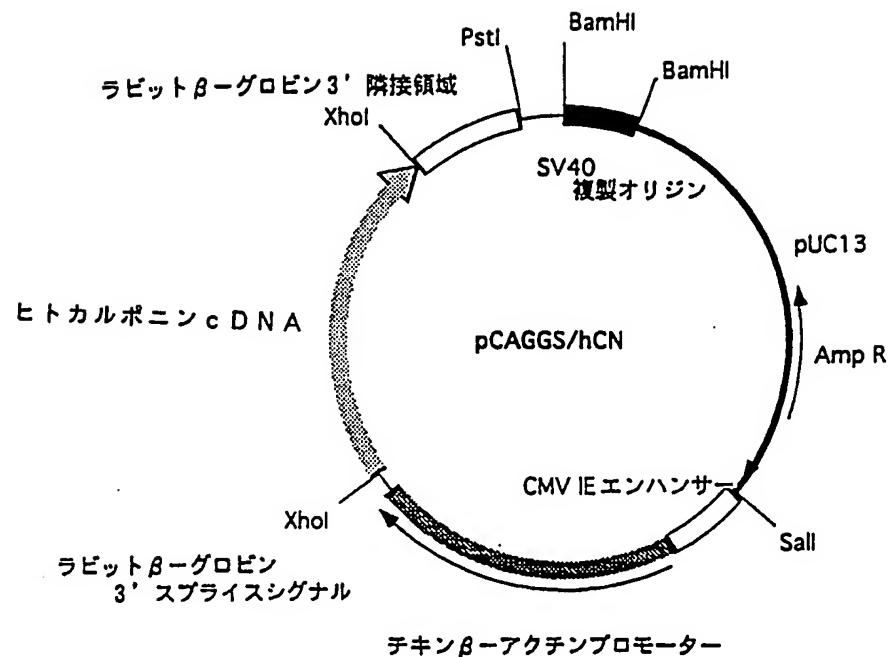
16. プロモーターがβ-アクチンプロモーターである、請求の範囲第15項記載の組換えベクター。

17. 組換えベクターが約6.5 kbの大きさを有し、サイトメガロウィルスのエンハンサー、チキンβ-アクチンプロモーター、ラビットβ-グロビン3'スプ

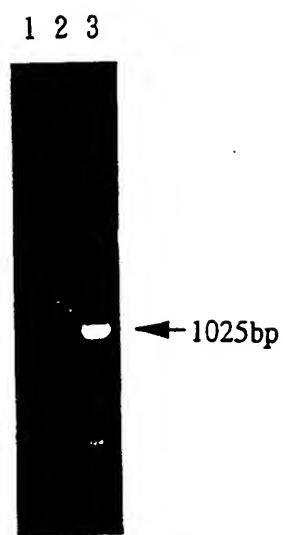
ライスシグナル、ラビット β -グロビン3'隣接領域、SV40複製オリジン、およびヒトカルポニンcDNAを含み、下記の制限酵素地図で表される組換えベクター-pCAGGS/hCNである、請求の範囲第16項記載の組換えベクター。



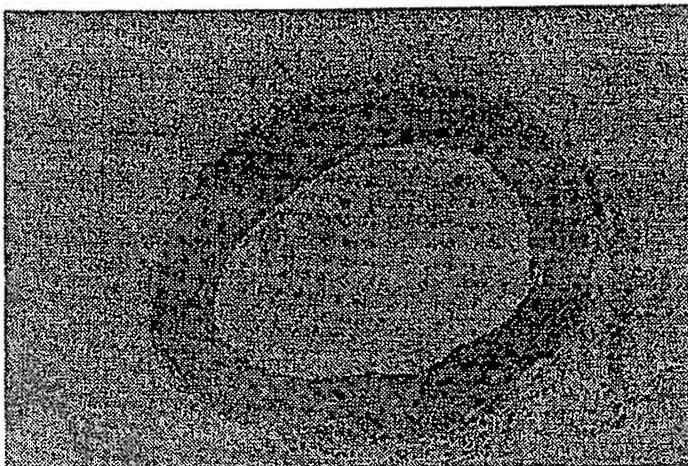
18. 有効成分であるカルポニン遺伝子および医薬的に許容できる賦形剤を含む医薬組成物。
19. 動脈硬化の治療に用いる請求の範囲第18項記載の医薬組成物。
20. 虚血性心疾患の治療に用いる請求の範囲第18項記載の医薬組成物。
21. 虚血性心疾患が狭心症である請求の範囲第20項記載の医薬組成物。
21. 虚血性心疾患が心筋梗塞症である請求の範囲第20項記載の医薬組成物。
22. 有効量のカルポニン遺伝子をヒトに投与することを特徴とする動脈硬化の治療方法。
23. 有効量のカルポニン遺伝子をヒトに投与することを特徴とする虚血性心疾患の治療方法。
24. 虚血性心疾患が狭心症である請求の範囲第23項記載の治療方法。
25. 虚血性心疾患が心筋梗塞症である請求の範囲第23項記載の治療方法。



第 1 図

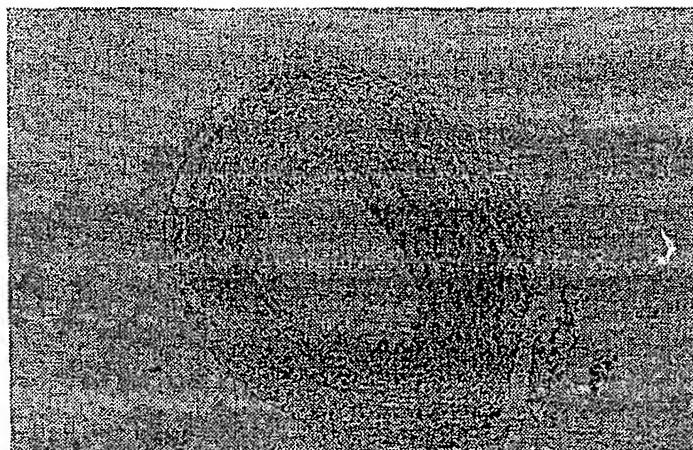


第 2 図

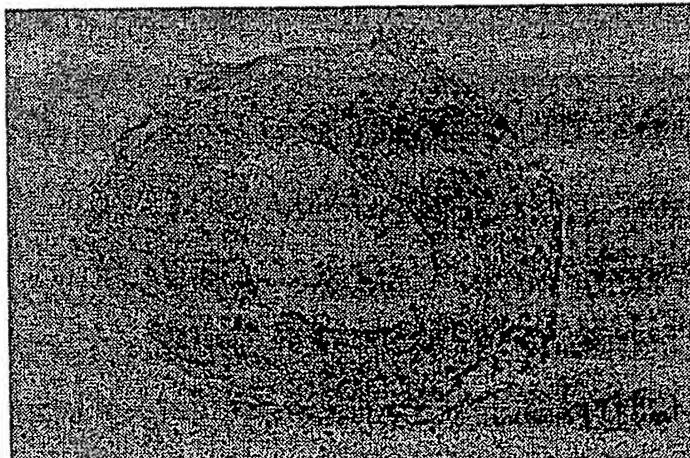


第3図

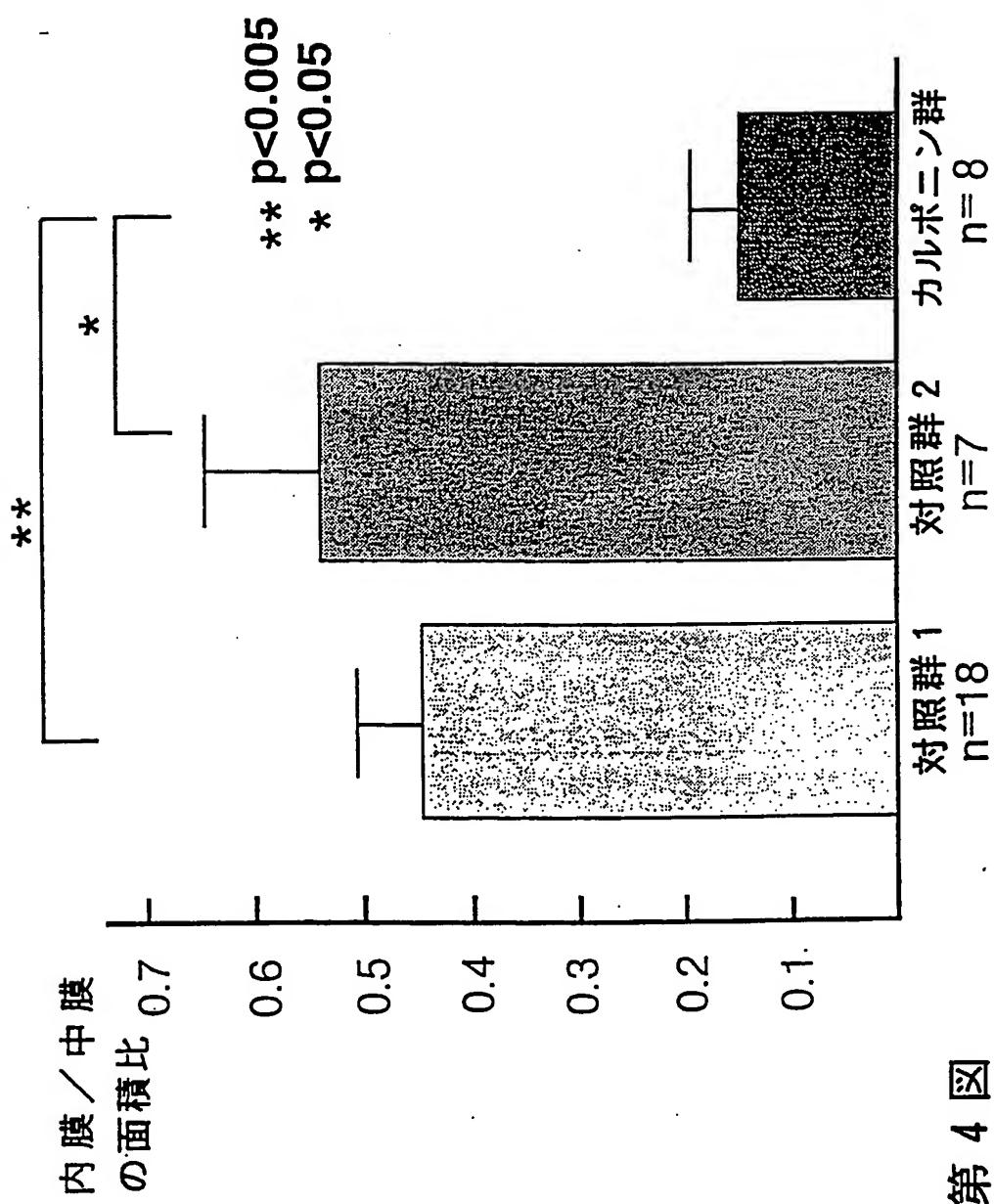
(a)



(b)



(c)



第4図

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP94/00320

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. C15 A61K48/00, A61K31/70 ABX, C12N15/12//A61K37/02,
C12N15/85

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C15 A61K48/00, A61K37/70, A61K37/02, C12N15/12,
C12N15/85

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE, BIOSIS PRE VIEWS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Journal of Clinical Investigation, volume 90, No. 3, (1992), Leclerc. G. et. al.: "Percutaneous arterial gene transfer in a rabbit model. Efficiency in normal and balloon-dilated atherosclerotic arteries.", see P. 936-944	1-21
A	Japanese Circulation Journal, volume 56, (1992), Takahashi K. et. al., see P. 40	1-21
A	Circulation Research, volume 73, No. 1, (1993), Shanahan. C. M. et. al.: "Isolation of gene markers of differentiated and proliferating vascular smooth muscle cells.", see P. 193-204	1-21
A	Gene, volume 108, No. 2, (1991), Niwa. H. et. al.: "Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector.", see P. 193-200	1-21

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

May 13, 1994 (13. 05. 94)

Date of mailing of the international search report

May 31, 1994 (31. 05. 94)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP94/00320

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 22–25
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 22 through 25 set forth inventions pertaining to therapeutic methods wherein the human body constitutes an indispensable feature, and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. CL³ A 61K 48/00, A 61K 31/70 ABX,
C 12N 15/12//A 61K 37/02, C 12N 15/85

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. CL³ A 61K 48/00, A 61K 37/70, A 61K 37/02,
C 12N 15/12, C 12N 15/85

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE, BIOSIS PRE VIEWS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Journal of Clinical Investigation, volume 90, №3, (1992), Leclerc, G. et al.: "Percutaneous arterial gene transfer in a rabbit model. Efficiency in normal and balloon-dilated atherosclerotic arteries.", see p.936-944	1-21
A	Japanese Circulation Journal, volume 56, (1992), Takahashi, K. et al., see p.40	1-21

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日
 若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献
 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日
 の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のため引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13. 05. 94

国際調査報告の発送日

31.05.94

名称及びあて先
 日本国特許庁 (ISA/JP)
 郵便番号 100
 東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官(権限のある職員)

齊藤 真由美

4 B 8 9 3 1

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C(続き) 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Circulation Research, volume 73, №1, (1993), Shanahan C. M. et al. : "Isolation of gene markers of differentiated and proliferating vascular smooth muscle cells.", see p.193-204	1-21
A	Gene, volume 108, №2, (1991), Niwa, H. et al. : "Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector.", see p.193-200	1-21

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの1の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 22-25 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、

請求の範囲 22-25 は、ヒトの身体を必須の構成要件とする治療方法の発明であり、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39(iv)の規定により、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。

2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの2の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。